

アデノ随伴ウイルスによる小児期遺伝性疾患治療 ～新規 AADC 欠損症患者の診断と適応疾患拡大を目指して～

小坂 仁¹、中村幸恵¹、才津浩智²、松本直通²、山形崇倫¹
¹自治医科大学小児科学、²横浜市立大学医学研究科遺伝学

研究要旨

新規 AADC 欠損症患者の診断

アデノ随伴ウイルス（adeno-associated virus：AAV）による治療が計画されている芳香族 L アミノ酸脱炭酸酵素欠損症、AADC 欠損症は、世界での報告例は 100 症例程度である。本邦においては現在まで 3 例診断されていたが、今回エクソームシーケンスにより原因遺伝子；DDC に c.315G>C, p.W105C /c.385C>T, p.P91S の新規変異を 3 才女兒に認め髄液中モノアミン値血漿中 AADC 酵素活性値測定により診断確定した。本児では、神経回路網の完成前に、ウイルスベクターによる治療を行うことが可能であるため、より強い効果が期待できる。

新たな対象疾患の拡大

小児期遺伝性疾患は、機能喪失により発症する疾患が多く、原因蛋白の発現増加により、機能回復を見るため、ウイルスベクター治療の良い適応となる。AADC 欠損症に引き続き AAV 治療を拡大するためグルコーストランスポーター 1 型（Glut 1）欠損症の治療研究に着手した。Glut 1 (SLC2A1) の一過性発現により細胞膜表面での細胞内局在を確認し、糖取込試験により、細胞内糖取り込みが、有意に上昇することを確認した。現在 2 型 AAV ベクターを作製しており、今後 glut1 ノックアウトマウス(ヘテロ体)への治療を行い、AADC 同様臨床研究実施を目指している。小児期遺伝性神経疾患は、それぞれの症例数は 100 例前後と希少で種類の多い疾患からなり、Glut1 欠損症の治療法の確立により更に多くの患者の治療が可能になる。

A . 研究目的

アデノ随伴ウイルス（adeno-associated virus：AAV）は遺伝性疾患治療において、現在最も有望視されている遺伝子治療のベクターであり、本研究班では、AAV ベクターを用いたアミノ酸脱炭酸酵素欠損症；Aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) 欠損症での、遺伝子治療臨床研究を

進めている。AAV ベクターによる遺伝子導入は現在治療法の存在しない多くの小児難治性遺伝性疾患患者および家族にとり、大きな希望となっている。この治療法を、今後多くの患児に行うためには、未診断例から確定診断例を増やす取り組みと、AADC 欠損症に加え、新たな対象疾患の拡大が必要である。今回私達は、エクソームシーク

エンスにより、新規 AADC 欠損症患者を見出すとともに、治療のモデルとしてグルコーストランスポーター 1 型欠損症治療研究に着手したので報告する。

B . 研究計画・方法 (概要)

新規 AADC 欠損症患者の診断

症例 ; 3 才女児。在胎 41 週 2 日 2978g , アプガールスコア 8 点 (1 分) /9 点 (5 分) で吸引分娩にて出生した。日齢 1 にけいれん様の動きがあり、近医へ搬送された。1 ヶ月間 NICU で入院加療をうけたが、明らかなけいれんを認めず、頭部 CT でも異常を認めないため退院した。9 ヶ月時、頸定・寝返りがないため、療育センターでの訓練が開始された。10 ヶ月発達遅滞精査が行われたが MRI 検査および尿中有機酸分析、TORCH , アミノ酸分析 , タンデムマス分析等で異常が認められなかった。2 歳 7 ヶ月初診時現症では、意識清明、一般理学的所見に異常なし。固視・追視あり、笑顔あるが、表情に乏しく軽度眼瞼下垂あり、口をとがらせることで意思表示可能であった。筋力は、上下肢とも 4/5 であり、筋緊張は低下し、姿勢は下肢でカエル様肢位をとり、左凸の側彎を認めた。間欠的な四肢のジストニアが認められたが、その他ヒョレアなどの不随意運動はなく、眠い時に眼球上転を繰り返していた。その他発汗過多、流涎は多く、恒常的に下痢を認めていた。一般生化学検査、髄液・血液・尿検査、脳血流 SPECT , MRI はいずれも正常であった。方法 ; 血液から採取した DNA を Sure Select Human All Exon v4 Kit (51Mb; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) でキャプチャーした後、Illumina HiSeq2000 (Illumina, San Diego, CA) を用い、シーケンスを行い、CASAVA ソフトウェア v1.8 (Illumina) を用いてエクソーム解析を行った。

(倫理面への配慮)

神奈川県立こども医療センター倫理委員会承認の説明書の書式に則り、遺伝カウンセリングの上、書面にて承諾を得た。

新たな対象疾患の拡大

小児期遺伝性疾患は、AADC 欠損症のように劣性遺伝形式を取り、機能喪失により発症する疾患が多い。これらの多くは、蛋白導入により、機能回復を見る。厳密な量の制御は必要ない場合が多く、ウイルスベクター治療の良い適応となる。この点において、優性遺伝形式をとり、新たな機能すなわち細胞毒性の獲得により、発症する成人疾患と大きく異なる。AADC 欠損症に引き続き AAV 治療を拡大することが求められる。今回、劣性遺伝形式の小児期発症神経疾患として、グルコーストランスポーター 1 型欠損症 ; Glucose transporter type 1 deficiency; Glut1 欠損症を取り上げた。この疾患は、中枢神経系の内皮細胞に発現する Glut1 の欠損により、中枢神経の低血糖症状を呈し、小頭症、てんかん、知的発達遅滞等の重篤な症状をとる疾患である。蛋白が糖の取り込みに関するトランスポーターであり機能が明らかであり、かつホモロジーモデリングにより、構造決定されており、遺伝型と表現型の相関も明確であり、疾患モデルマウスも存在するため、治療効果を判定するプロトタイプとしてこの疾患を取り上げた。

C . 研究結果

新規 AADC 欠損症患者の診断

結果 ; AADC 欠損症の原因遺伝子である DDC に c.315G>C, p.W105C (母親由来) および c.385C>T, p.P91S (父親由来) いずれも新規変異 (The Human Gene Mutation Database による解析) を認めた。これらは日本人 406 名のノーマルコントロールにおいて認められない変異であった。

この結果を踏まえ、髄液中モノアミン値

を測定したところ、L-dopa は 15.5ng/ml (正常値<4.9 と著増し) 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol, MHPG は <1.0 ng/ml (正常値 8~43) であり低値であった。また血漿中 AADC 酵素活性値測定を、チューリッヒ大学小児病院に依頼し、3.62 pmol/min/ml (正常値 36-129) と下限値の約 10% であり、診断が確定した。

新たな対象疾患の拡大

Glut 1 (SLC2A1) 発現ベクターを HEK293 細胞 (ヒト胎児腎臓由来細胞) に一過性に発現させ、ウエスタンブロッティングにより、目的の分子量に外来性 *Glut 1* の発現を確認した。またタグに対する抗体染色により、細胞膜表面での細胞内局在を確認した。また 2-デオキシグルコース (2DG) 取込試験により、細胞内のリン酸化 2DG6-リン酸を測定し糖取り込みが、有意に上昇することを確かめた。

D . 考察

新規 AADC 欠損症患者の診断

芳香族 L アミノ酸脱炭酸酵素欠損症 Aromatic L-amino acid decarboxylase, AADC 欠損症 (MIN608643) は、カテコールアミンとセロトニンを合成する酵素 ; AADC をコードする遺伝子の変異により発症する常染色体劣性遺伝性疾患である。1990 年に、初めて報告され、現在までに世界での報告例は 100 症例程度である。日本では、今までに 3 例診断されていたが、今回新たに 1 例診断を診断確定した。AADC は、チロシンから生成された L-dopa をドパミンに、また、トリプトファンから生成された 5-ハイドロキシトリプトファンをセロトニンに代謝する酵素である。ドパミンからは、ノルエピネフリン、エピネフリンが合成されるため、これらのカテコールアミン全体が低下する。本児では髄液で、ドパミンの前駆体の、L-dopa が著増するととも

に、ノルエピネフリンの代謝物である PHPG は減少していた。また臨床症状としては、カテコラミンとセロトニンの合成が障害されることにより、乳幼児期に重度の運動障害で発症し、主な症状としては、筋緊張低下、眼球上転発作 (oculogyric crises)、知的障害、体温異常、摂食困難などを伴う。また、メラトニン低下による睡眠障害や自律神経機能障害による、心拍・血圧の調整障害、突然の発汗上昇、唾液分泌増加や、情緒不安定、睡眠障害もみられ、本例では多くの症状が合致していた (下線部は本例で認められた症状)。以上の臨床症状に加え、髄液検査、遺伝子検査、および酵素活性測定より、診断が確定した。なお、ホモロジーモデリングからは、変異アミノ酸残基は基質結合面にはないため、活性低下はアロステリック効果によりもたらされるものと考えられた。

新たな対象疾患の拡大

現在 SLC2A1 遺伝子導入 2 型 AAV ベクター (pAAV-SLC2A1-2) を作製しており、今後神経系ヒト培養細胞 (SH-SY5Y 細胞) に遺伝子導入し、発現確認した後 *Glut1* KO マウス (ヘテロ体) に pAAV-SLC2A1-2 を脳室内注入発現確認、機能評価 ; 髄液糖測定マウス行動解析マウス脳組織を用いた電気生理検査 (共同研究) 脳波検査、を行い、AADC 同様臨床研究実施を目指している。

5 . 結論

新規 AADC 欠損症患者の診断

AADC 欠損症患者の、示す症状は非特異的であり、本例の様に原因不明の低緊張あるいは脳性麻痺として、診断未定例が多いと思われる。神経伝達物質の低下という、”機能的”疾患ではあるが、診断が遅れた場合には、すでに神経回路の構成が、終了しており、症状の回復が難しいとされており、早期診断・早期治療のシステムを整える必

要がある。本症例のように、エクソームシーケンスにより、診断される症例は今後も拡大する可能性はあるが、検査施設は少なく、費用的にも高額なため当面限られた症例となろう。国内での遺伝子治療の実施により、“治療できる疾患”として、この疾患の認知度は高まると予想される。現在国内で、AADCの酵素活性を測定できる施設がないため、確定診断と残存酵素活性による重症度の予測が困難である。この検査法の確立は次年度の課題としたい。

新たな対象疾患の拡大

AADC欠損症に対する遺伝子治療を国内における難治性神経疾患のさきがけとして、更に治療を拡大するためのプロトタイプとしてGlut1欠損症治療研究に着手した。小児期遺伝性神経疾患は、それぞれの症例数は100例前後（希少で）の数多くの（種類の多い）疾患からなる。AADCのように発現が、脳内の基底核に限られた疾患は、むしろ稀である。Glut1欠損症のように、欠損蛋白が、広く脳内に分布するものが多いため、Glut1欠損症の治療法の確立は多くの適応疾患拡大につながる。

参考文献

AADC欠損症; Brun L, Ngu LH, Keng WT, Ch'ng GS, Choy YS, Hwu WL, et al. Clinical and biochemical features of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Neurology*. 2010;75:64-71.

1, 論文発表

Takanashi J, Osaka H, Saitsu H, Sasaki M, Mori H, Shibayama H, Tanaka M, Nomura Y, Terao Y, Matsumoto N, Barkovich AJ. Different patterns of hypomyelination and cerebellar abnormality between POLR3A and

POLR3B mutations. *Brain Dev* in press.

Ravenscroft G, Miyatake S, Lehtokari VL, Todd EJ, Vornanen P, Yau KS, Hayashi YK, Miyake N, Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu H, Osaka H, Yamashita S, Ohya T, Sakamoto Y, Koshimizu E, Imamura S, Yamashita M, Ogata K, Shiina Bryson-Richardson RJ, Vaz R, Ceyhan O, Brownstein CA, Swanson LC, Monnot S, Romero NB, Amthor H, Kresoje N, Sivadorai P, Kiraly-Borri C, Haliloglu G, Talim B, Orhan D, Kale G, Charles AK, Fabian VA, Davis MR, Lammens M, Sewry CA, Manzur A, Muntoni F, Clarke NF, North KN, Bertini E, Nevo Y, Willichowski E, Silberg IE, Topaloglu H, Beggs AH, Allcock RJ, Nishino I, Wallgren-Pettersson C, Matsumoto N, Laing NG. Mutations in KLHL40 Are a Frequent Cause of Severe Autosomal-Recessive Nemaline Myopathy. *Am J Hum Genet* 2013; 93: 6-18.

Anselm I, Azzouz H, Bratkovic D, de Brouwer A, Hamel B, Kleefstra T, Yntema H, Campistol J, Vilaseca MA, Cheillan D, D'Hooghe M, Diogo L, Garcia P, Valongo C, Fonseca M, Frints S, Wilcken B, von der Haar S, Meijers-Heijboer HE, Hofstede F, Johnson D, Kant SG, Lion-Francois L, Pitelet G, Longo N, Maat-Kievit JA, Monteiro JP, Munnich A, Muntau AC, Nassogne MC, Osaka H, Ounap K, Pinard JM, Quijano-Roy S, Poggenburg I, Poplawski N, Abdul-Rahman O, Ribes A, Arias A, Yapliito-Lee J, Schulze A, Schwartz CE, Schwenger S, Soares G, Sznajder Y, Valayannopoulos V, Van Esch H, Waltz S, Wamelink MM, Pouwels PJ, Errami A, van der Knaap MS, Jakobs C, Mancini GM, Salomons GS. Phenotype and genotype in 101 males with X-linked creatine transporter deficiency. *J Med Genet* 2013; 50:463-472.

Mitani T, Aida N, Tomiyasu M, Wada T, Osaka H. Transient ischemic attack-like episodes without stroke-like lesions in MELAS. *Pediatr Radiol* 2013; 43: 1400-1403.

Kato H, Miyake F, Shimbo H, Ohya M, Sugawara H, Aida N, Anzai R, Takagi M, Okuda M, Takano K, Wada T, Iai M, Yamashita S, Osaka H. Urine screening for patients with developmental disabilities detected a patient with creatine transporter deficiency due to a novel missense mutation in SLC6A8. *Brain Dev* in press.

Nakamura K, Kato M, Osaka H, Yamashita S, Nakagawa E, Haginoya K, Tohyama J, Okuda M, Wada T, Shimakawa S, Imai K, Takeshita S, Ishiwata H, Lev D, Lerman-Sagie T, Cervantes-Barragan DE, Villarroel CE, Ohfu M, Writzl K, Gnidovec Strazisar B, Hirabayashi S, Chitayat D, Myles Reid D, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hayasaka K, Matsumoto N, Saitsu H. Clinical spectrum of SCN2A mutations expanding to Ohtahara syndrome. *Neurology* 2013; 81: 992-998.

Nakamura K, Kodera H, Akita T, Shiina M, Kato M, Hoshino H, Terashima H, Osaka H, Nakamura S, Tohyama J, Kumada T, Furukawa T, Iwata S, Shiihara T, Kubota M, Miyatake S, Koshimizu E, Nishiyama K, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hayasaka K, Ogata K, Fukuda A, Matsumoto N, Saitsu H. De Novo Mutations in GNAO1, Encoding a Galphao Subunit of Heterotrimeric G Proteins, Cause Epileptic Encephalopathy. *Am J Hum Genet* 93: 496-505.

Imagawa E, Osaka H, Yamashita A, Shiina M, Takahashi E, Sugie H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H,

Ogata K, Matsumoto N, Miyake N. A hemizygous GYG2 mutation and Leigh syndrome: a possible link? *Hum Genet* in press.

Ohba C, Osaka H, Iai M, Yamashita S, Suzuki Y, Aida N, Shimozawa N, Takamura A, Doi H, Tomita-Katsumoto A, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Eto Y, Tanaka F, Matsumoto N, Saitsu H. Diagnostic utility of whole exome sequencing in patients showing cerebellar and/or vermis atrophy in childhood. *Neurogenetics* 2013; 14: 225-232.

Kodera H, Nakamura K, Osaka H, Maegaki Y, Haginoya K, Mizumoto S, Kato M, Okamoto N, Iai M, Kondo Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Hayasaka K, Sugahara K, Yuasa I, Wada Y, Matsumoto N, Saitsu H. De novo mutations in SLC35A2 encoding a UDP-galactose transporter cause early-onset epileptic encephalopathy. *Hum Mutat.* 2013;34: 1708-1714.

Ohshiro-Sasaki A, Shimbo H, Takano K, Wada T, Osaka H. A Three-Year-Old Boy With Glucose Transporter Type 1 Deficiency Syndrome Presenting With Episodic Ataxia. *Pediatr Neurol* in press.

Matsufuji M, Osaka H, Gotoh L, Shimbo H, Takashima S, Inoue K. Partial PLP1 Deletion Causing X-Linked Dominant Spastic Paraplegia Type 2. *Pediatr Neurol.* 2013; 49: 477-481.

Akiyama T, Osaka H, Shimbo H, Nakajiri T, Kobayashi K, Oka M, Endoh F, Yoshinaga H. A Japanese Adult Case of Guanidinoacetate Methyltransferase Deficiency. *JIMD Rep.* 2013 Jul 12.

Abe J, Nakamura K, Nishikomori R, Kato M, Mitsuiki N, Izawa K, Awaya T, Kawai T, Yasumi T, Toyoshima I, Hasegawa K, Ohshima Y, Hiragi T,

Sasahara Y, Suzuki Y, Kikuchi M, Osaka H, Ohya T, Ninomiya S, Fujikawa S, Akasaka M, Iwata N, Kawakita A, Funatsuka M, Shintaku H, Ohara O, Ichinose H, Heike T. A nationwide survey of Aicardi-Goutieres syndrome patients identifies a strong association between dominant TREX1 mutations and chilblain lesions: Japanese cohort study. *Rheumatology (Oxford)*. 2013 Dec 3.

Okabe T, Aida N, Niwa T, Nozawa K, Shibasaki J, Osaka H. Early magnetic resonance detection of cortical necrosis and acute network injury associated with neonatal and infantile cerebral infarction. *Pediatr Radiol*. 2014 Jan 14. [Epub ahead of print] 31.

Wada T, Haddad MR, Yi L, Murakami T, Sasaki A, Shimbo H, Kodama H, Osaka H, Kaler SG. A Novel Two-Nucleotide Deletion in the ATP7A Gene Associated With Delayed Infantile Onset of Menkes Disease. *Pediatr Neurol*. 2014 in press.

2. 学会発表

大城亜希子、高木真理子、安西理恵、奥田美津子、高野亨子、和田敬仁、井合瑞江、山下純正、小坂仁、相田典子：全脊髄炎を呈し、重度の後遺症を残した急性散在性脳脊髄炎の一例 第58回日本小児神経学会関東地方会 2013.3.9. 東京（東京医科大学病院）

Nakamura K, Kato M, Osaka H, Yamashita S, et al. : Clinical spectrum of SCN2A mutations expanding to Ohtahara syndrome 第55回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1. 大分

萩野谷和裕、加藤光広、小坂仁、横地健治、荒井洋、和田敬仁、小山典久、近藤典子、高橋悟、平林伸一、平井聡里、才津浩智：COL4A1 変異の臨床病型の広がり：孔脳症から裂脳症まで。 第55回日本小

児神経学会 2013.5.29-2013.6.1. 大分

Osaka H, Takagi M, Okuda M, Anzai R, et al. : A rapid screening for the genetic diagnosis of Leigh syndrome. 第55回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1. 大分

高野亨子、高木真理子、奥田美津子、和田敬仁、井合瑞江、山下純正、小坂仁：生後4カ月に発症し急速な退行を示した vanishing white matter disease の1例 第55回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1. 大分

高木真理子、高野亨子、奥田美津子、和田敬仁、井合瑞江、山下純正、小坂仁：m.3697G>A/ND1 変異を認めた Leigh 症候群の2症例 第55回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1. 大分

黒田友紀子、大橋育子、高野亨子、和田敬仁、松井潔、小坂仁、黒澤健司：次世代シーケンサーを用いた小児神経疾患のターゲットシーケンス解析のワークフロー 第55回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1. 大分

山本亜矢子、大城亜希子、安西理恵、高木真理子、奥田美津子、新保裕子、高野亨子、和田敬仁、井合瑞江、山下純正、小坂仁：ATG>AGG (開始コドン)の変異で軽症の表現型を示した Pelizaeus-Merzbacher 病の一男児例 第55回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1. 大分

小坂仁：小児期発症の脊髄小脳変性症：レビューと鑑別診断 シンポジウム 2DNA 修復障害と神経変性 第55回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1. 大分

山下純正、和田敬仁、小坂仁、柴崎淳、松井潔：ポーランドメービウス症候群の神経病理 血管障害との関連において 第55回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1. 大分

奥田美津子、安西理恵、高木真理子、高野

亨子、和田敬仁、井合瑞江、山下純正、小坂仁、新宅治夫：日内変動のあるジストニアを認め、遺伝子解析で瀬川病と診断した9歳女児例 第55回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1. 大分

宮武聡子、輿水江里子、林由起子、Ravenscroft G、三宅紀子、土井宏、鶴崎美德、才津浩智、小坂仁、他：ネマリオンミオパチーの新規原因遺伝子 KLHL40 の同定 第58回日本人類遺伝学会 2013.11.20-11.23. 仙台

大場ちひろ、小坂仁、井合瑞江、山下純正、鈴木ゆめ、相田典子、土井宏、他：小児期に小脳萎縮を呈する疾患における全エクソーム解析による遺伝子診断第58回放射線科 日本人類遺伝学会 2013.11.20-11.23. 仙台

小寺啓文、中村和幸、秋田天平、椎名政昭、加藤光広、星野英紀、寺嶋宙、小坂仁、他：3量体Gタンパク質GαoサブユニットをコードするGNAO1のde novo変異はてんかん性脳症を引き起こす 第58回日本人類遺伝学会 2013.11.20-11.23. 仙台

今川英里、小坂仁、山下暁朗、椎名政昭、高橋英彦、杉江秀夫、中島光子、鶴崎美德、才津浩智、緒方一博、松本直通、三宅紀子：ケトン血症を伴うLeigh脳症兄弟例のエクソーム解析 第58回小児科 日本人類遺伝学会 2013.11.20-11.23. 仙台

和田敬仁、立川正憲、伊藤慎悟、大槻純男、新保裕子、小坂仁：クリアチントランスポーター欠損症5家系の分子遺伝学的検討 第58回神経内科 日本人類遺伝学会 2013.11.20-11.23. 仙台

高野亨子、小坂仁、大橋育子、黒田友紀子、黒澤健司、相田典子、村山圭：14q12欠失症候群の1例 第58回代謝科 日本人類遺伝学会 2013.11.20-11.23. 仙台

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし